魯冰根瘤菌之研究

林 敬 德

一、緒　　言

茶爲本省主要外銷農產之一，其產地分佈於中北部之丘陵地或洪積層臺地地帶，其土壤概屬於黃棕壤或紅棕壤[1]。一般言，此等土壤之鉀、磷等植物養份含量頗低，且因氣溫暖熱，終年宜於土壤微生物活動，有機質分解甚爲迅速，又雨水充沛極易流失等，因此地力可謂頗瘦瘠。

近年來有關機關輔導茶業生產有方[2]，極力推行剪枝，老樹更新，施肥或栽植黃花魯冰(Lupinus luteus)等，在生產上改進頗多，蓋魯冰爲荳科植物之一，係一年生直立性草本，耐酸性頗强，瘠地亦能生長，且含多量有機物及氮、磷、鉀等，充作茶園間作綠肥，確屬最爲適合。

荳科植物之肥料價值，遠在希臘、羅馬時代已有所認識，而普遍栽植利用，尤其 Cato, Varro 兩氏[3]極力提倡栽植魯冰，但當時因不明根瘤之本質，乃無法知其所以然。直至1838年 Boussingault 氏[4]經精密試驗，始證實荳科植物能固定空中游離氮素。於1858年 Lachmann 氏觀察謂，根瘤係由運動性細菌所形成，而且負有固定氮素之作用等，綠肥能肥田之奧妙原因遂逐漸釋明。1888年 Beijerinck 氏始分離成功，並得培養純粹根瘤菌，而更經諸多學者廣汎之研究，遂得闡明根瘤之本質，根瘤菌之性能及根瘤菌與寄主荳科植物之共生關係，並確立共生氮素固定作用(Symbiotic Nitrogen Fixation)等。據 Bergey 氏[5]分類法，本菌係屬於魯冰根瘤菌——Rhizobium lupini (Schroeter)，而青花種 (L. angustifolius)，黃花種 (L. luteus)，白花種 (L. albus)，Washington lupine (L. polyphyllus), Sundial (L. perennis)[6]，及 Serradella (Ornithopus Sativus) 等，均屬同一交互接種羣 (Cross inoculation group)。Nobbe, Hiltner 兩氏[7]於1895年提倡純粹培養菌之接種，且以 Gelatin 培養基培養製成"Nitragin"接種劑，並商品化應市。自此以來關於根瘤菌及接種劑製造法之改進等研究可謂不勝枚舉。在本省雖已有前臺北帝大教授足立仁博士之研究[8]。前臺灣農會事業部長小野氏[9]曾施行魯冰及青皮豆田間接種試驗及中興大學農學院農化系教授吳敏慧之研究[10,11]，但較之綠肥之品種、栽培、適肥等研究工作，却嫌不够深入，而且亟待開發農林邊際地帶之今日，爲確保土壤之生產力及水土保持計，與綠肥研究相配合，著者認爲荳科作物根瘤菌爲至值得注意的問題。

本研究爲闡明根瘤菌之細菌學的性質，並純粹培養優良菌種，以供栽培時接種應用，而提高產量及增進土壤潛在地力爲目的。

本研究承所長徐水泉博士及農化系主任梁鉅榮先生指教，復蒙中國農村聯合委員會補助室內儀器設備，及該會朱海帆先生勉勵並惠賜"Nitragin"接種劑，並承林技士禮輝帮助，文成，荷蒙臺灣大學教授劉伯文先生撥冗斧正，誌此一並謹表謝忱。

二、魯冰菌之分離及檢定

(一)培養基

適宜於根瘤菌之培養基有 Ashby 氏培養基，土壤抽出液及酵母抽出液甘露醇等[12]多種。就中以後者爲最優，本試驗所用者即是後者，其組成份如次。

甘　露　醇 (Mannitol)……………………10 gm

磷 酸 二 鉀 (K_2HPO_4) ……………………0.5 gm

硫　酸　鎂	($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)…………………0.2 gm
氯　化　鈉	(Nacl)……………………………0.1 gm
碳　酸　鈣	($CaCO_3$)…………………………3.0 gm
酵母抽出液	(yeast extract) ………………100 ml
洋　　　菜	(Agar)………………………15～20 gm
蒸　溜　水	(Distilled Water) ……………900 ml

(二)分離方法

選取生育良好魯冰(本所農藝系魯冰圃場)之充實的幼根瘤，先以流水冲洗除去泥沙後，浸漬於0.1%昇汞液 4～5 分，然後以鑷子移至於盛殺菌水之燒杯中浸漬，並以殺菌水冲洗數次，至洗液呈無昇汞痕跡始止，置於經殺菌並盛少量殺菌水之小型培養皿内，以玻璃棒壓碎或以殺菌刀片切開並削除外皮，攪碎内部細胞並與水混成漿液。取根瘤漿液一鉑耳量，依次逐次稀釋於另培養皿，及時以酵母抽出液甘露醇培養基施行平面培養，於 25°C 培養10～14天，如斯重複平面培養二～三次後，選留菌落呈全緣、丘狀、平滑、白色者並移至同培養基斜面上保存培養之。

(三)根瘤形成能力試驗[13]

設 500 ml 廣口瓶並挿裝小玻璃管至瓶底，盛矽砂九份量，加適量 Crone 氏[13]無氮溶液，蓋玻璃紙，於16磅加壓殺菌二小時。冷後播種經0.1%昇汞液殺菌並於培養皿洋菜面上使其發芽(芽長 2～4 mm) 之種子各三粒，立卽分注供試菌之殺菌水懸濁液於種子，蓋以殺菌砂及覆蓋玻璃紙，三瓶爲一組並設不接種對照區，置於窗邊之無菌箱內，而以殺菌水灌溉及每 3～5 天以 Aspirator 從小玻璃管吸出並更新適量 Crone 氏液等繼續栽培30～40天。

(四)結果

以流水冲洗除去矽砂後，調査根瘤形成情況，葉色及株重等結果，接種區各株於主根或支根部位均形成根瘤，且葉綠色亦濃，但對照者概爲根系細長而無根瘤形成，而且葉色多呈淡綠乃至黃綠色等，顯示氮素缺乏現象。由此結果可認本根瘤菌確屬魯冰菌，並具根瘤形成能力頗顯明無誤。尤其 L. 6, L. 7, L. 5 號菌認爲最優而選留以供試驗。L. 5 號菌係自美國 "Nitragin" 公司之接種劑 (Commercial culture) 分離。

三、形態及培養的性質

(一)形態[14]

以酵母抽出液甘露醇洋菜，於 25°C 培養 2～5 天之菌體而言，本菌之染色性概以 Ziehl 氏 Carbol-fuchsin 爲佳良，而菌型爲短桿狀乃至桿狀型，並無假菌體 (Bacteroid)，其菌體大小，格氏染色性及鞭毛等如表一。

(二)培養的性質

培養方法

1. 酵母抽出液甘露醇洋菜之平面、斜面、穿刺培養：於 25°C 培養 5～7 天。
2. Gelatin 穿刺培養：以 Salle 氏[15] Nutrient gelatin，於 18°C 培養21天。
3. 馬鈴薯斜面培養：依 Löhnis, Hansen 兩氏[16]之方法於 25°C 培養14天。
4. 石蕊乳精 (Litmus milk)[12]：於 25°C 培養14天。
5. 肉汁液培養[17]：用亞鈴肉汁粉末(日嵯峨山商店製)調配並於 25°C 培養14天。

實驗結果

表一　魯冰菌之形態及培養的性質

Table 1. Morphology and cultural characters of Rhizobium lupini

		菌種 Strain	L. 5	L. 6	L. 7
形態 Morphology		菌體大小 Size of the cells	1.2～3.2×0.3～0.6 μ	1.2～3.3×0.3～0.6 μ	1.2～3.2×0.3～0.6 μ
		格氏染色性 Gram's stain	—(陰性)	—(陰性)	—(陰性)
		鞭毛 Flagella	單極毛	單極毛	單極毛
酵母抽出液甘露醇洋菜 Yeast extract mannitol agar		平面培養 Plate culture	發育緩慢，菌落呈圓形，表面平滑，初時扁平後變稍丘狀，全緣，內容均質，眞珠白色，不透明，濕光澤。	發育緩慢，圓形，丘狀～中高，全緣，均質，乳白色，初時稍透明後變不透明，濕光澤，頗粘稠。	發育緩慢，圓形，平滑，丘狀，全緣，均質，稍眞珠白色，不透明，濕光澤。
		斜面培養 Slant culture	發育中庸，絲狀，丘狀，濕光，表面平滑，不透明眞珠白色，稍泥質。	發育良好，絲狀，稍中高，濕光，平滑，初透明後變不透明，乳白色，頗粘稠，生成多量樹膠質。	發育中庸，絲狀，丘狀，濕光澤，表面平滑，不透明，眞珠白色，泥質。
		穿刺培養 Stab culture	絲狀	絲狀	絲狀
Gelatin		穿刺培養 stab ctlture	發育頗不良，不液化。	殆不發育，不液化。	殆不發育，不液化。
馬鈴薯斜面培養 Potato slant culture			發育不良，薄膜乃至扁，平稍透明，白色粘質。培養基不變色。	發育頗不良，薄膜透明。培養基不變色。	發育不良，薄膜稍透明。培養基不變色。
石蕊乳精培養 Litmus milk culture			無乳清層之形成，鹼性反應。	無乳清層，微鹼性反應。	無乳清層，稍鹼性反應。
肉汁液培養 Nutrient broth			發育不良，微溷濁無沉澱。	殆不發育。	發育頗不良，極微溷濁。

四、生理的性質

(一)菌之生成物質

實驗方法

1. Indol 之檢定

培養基：消化蛋白質培養液 (Peptone Broth)，消化蛋白質（極東 Peptone，極東製藥所製）10 gm, Nacl 0.2 gm，蒸溜水 1,000 ml, pH 7.2。調配上記培養液並分注各 10 ml 於試管，以 100°C 30分施行間歇殺菌三天。接種酵母抽出液甘露醇新鮮培養菌一鉑耳量，並於 25°C 培養 2～7天，而以 Salkowsky 氏(18) 法檢定之。

2. 氨氣之檢定

如上施行培養後，以 Nessler 氏(18試藥檢定。

3. 亞硝酸之檢定

培養於含 0.1% KNO_3 之消化蛋白質培養液，然後以 Griess 氏(13)試藥檢定。

4. 硫化氫之檢定

調配含 0.1%醋酸鉛之肉汁洋菜培養基，pH 6.7，如常法施行平面培養，於 25°C 培養7天後，菌落周圍形或褐色圈帶者爲陽性。

實驗結果

表二 菌之生成物質

Table 2. Substances produced by Rhizobium lupini

生成物質 Bacterial products ＼ 菌種 Strain	L. 5	L. 6	L. 7
Indol 生成	－	－	－
氨氣生成 NH_3	+	+	+
硝酸鹽還元性 $NO_3 \rightarrow NO_2$	+	+	+
硫化氫生成 H_2S	－	－	－

+：陽性 Positive　　－：陰性 Negative

(二) pH 對菌生育之影響

實驗方法

1. 培養基調製：取定量之酵母抽出液甘露醇培養液，以 0.5 N HCl 或 NaOH，並用玻璃電極測定調配 pH 值 3～9 一連串培養液，然後添加適量蒸溜水，使各 pH 值培養液之濃度均一，並分注各 10 ml 於試管 (1.8 cm×18)，以加壓殺菌，殺菌後之 pH 值如表三。

2. 培養：各種 pH 值取三試管爲一組，接種酵母抽出液甘露醇培養液之新鮮培養菌一鉑耳量，並置於 25°C 定溫器，每隔二天觀察其生育一次，繼續培養七天後，以培養液溷濁度比較各 pH 值之生育優劣，並測定培養後 pH 值之變化。

實驗結果

表三 pH 對魯冰菌生育之影響

Table 3. Effect of pH on the growth of Rhizobium lupini

菌種 Strain	pH 值 ＼ 生育及 pH 變化 Crowth & Reaction	3.45	3.88	4.35	4.91	5.45	5.75	6.28	6.85	7.10	7.56	7.95	8.37	最適範圍 Optimum
L. 5	生育 Growth	－	－	－	+	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	5.5～6.9
	pH	3.05	3.75	4.25	5.10	6.50	6.80	7.00	7.15	7.25	7.30	7.62	7.65	
L. 6	生育 Growth	－	－	－	++	+++	+++	+++	++	++	+	+	±	5.5～6.3
	pH	2.95	3.70	4.25	5.40	6.50	6.70	6.90	7.08	7.20	7.50	7.70	7.60	
L. 7	生育 Growth	－	－	－	++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	5.5～6.9
	pH	3.05	3.82	4.15	5.10	6.60	6.70	7.05	7.10	7.15	7.45	7.60	7.65	

－：無生育 No growth　　±：不顯明 Doubtful　　+：生育不良 Scant growth

++：生育良好 Moderate growth　　+++：生育優良 Vigorous growth

根瘤菌之生育受培養基反應之影響甚大，一般言，其耐酸、耐鹼界限及最適宜 pH 值，因根瘤菌之種類而略有差異，Waksman 氏[14]認爲酸性界限爲 pH 3.2～5.0，鹼性界限爲 pH 9～10，最適宜者爲 pH 5.5～7.0。Fred, Davenport 兩氏[3]謂，魯冰菌之耐酸性最强，而 pH 3.2 爲界限。石澤氏[19]研究結果謂，魯冰菌之酸性界限爲 pH 4.94，而 pH 6.0～7.0 爲最適範圍。

本試驗結果如表三所示，L. 5 號菌之生育，於 pH 5.45～6.85 示最優，pH 7.10～7.56 爲良好，pH 7.95～8.37 及 pH 4.91 爲不良，pH 4.35 以下則無生育。L. 6 號菌者，pH 5.45～6.28 顯示最優，pH 6.85～7.10 及 pH 4.91 顯示良好，pH 7.56～7.95 爲不良，且 pH 8.37 則殆無生育等，顯示耐鹼性弱，耐酸性較强趨勢。L. 7 號菌於 pH 4.91 之生育較良好，略示傾向酸性外與

L. 5 號菌相同。

總之供試三菌種於各 pH 値之生育情形，雖略示差異，但可謂較接近，概以 pH 4.91 爲酸性界限，而 pH 5.45～6.85 爲最適宜範圍。

培養後 pH 値變化情形，三菌種均示同一傾向，無性育之 pH 4.35 以下者，顯示降低（酸性化），能生育範圍者， pH 4.91～7.10 顯示上昇（鹼性化），而 pH 7.56～8.37 却反顯示降低。能生育範圍之 pH 値之上昇或降低程度，雖因菌株 (Strain) 而參差不齊，但均示顯明傾向，即自酸鹼兩端向中性轉移之趨勢，此現象與石澤氏[19]於大豆菌（B 羣）及 Cowpea 菌（F. G. 羣）所觀察者相似。蓋魯冰菌於酵母抽出液甘露醇培養基上，能分泌鹼性物質使其反應鹼性化，因此本試驗 pH 4.91～7.10 培養基之 pH 値，傾向鹼性轉移者似可首肯，但 pH 7.56 以上及 pH 4.35 以下之酸性化者，雖得推爲甘露醇之生酸等，但明確情形認爲有待今後之研究。

(三)溫度對菌生育之影響

1. 最適溫度

實驗方法

酵母抽出液甘露醇培養液各 10 ml 分注於試管，加壓殺菌後接種同培養液之新鮮培養菌一鉑耳量，以三試管爲一組，置於 20～40°C 而每隔 2～5°C 設八個區分之定溫器，培養一週後以培養液之溷濁度比較各溫度之生育及繁殖優劣情形。

實驗結果

表四　溫度對魯冰菌生育之影響

Table 4. Effect of temperature on the growth of Rh. lupini

溫度 Temp. °C / 菌種 Strain	20	22	24	26	28	30	35	40	最適溫度 Optimum
L. 5	+	++	++	+++	+++	+++	++	−	26～30
L. 6	++	++	++	+++	+++	+++	+	−	26～30
L. 7	+	++	++	+++	+++	+++	++	−	26～30

−：無生育 No growth　　+：生育不良 Scant growth
++：生育良好 Moderate growth　　+++：生育優良 Vigorous growth

關於根瘤菌生育溫度之研究報告頗多，據 Waksman 氏[7]謂，生育溫度範圍爲 0～50°C，而 18～28°C 爲最適溫度。石澤氏[19]謂，魯冰菌及大豆菌以 32°C，紫苜蓿菌 (Alfalfa), Sesbania 菌爲 39～42°C，而概以 32～37°C 爲能生育之最高界限。生育適溫者，Bergey 氏[5]以 25°C，Allison, Minor 兩氏[20]認爲 30°C 爲最適宜。總之因根瘤菌種類及菌株之不同雖略示差異，可認爲對低溫之抵抗力較强，而耐熱力較弱，且 25～30°C 爲生育適溫。本試驗之結果如表四所示，L. 5, L. 7 號菌與 L. 6 號菌在 20°C 及 35°C 之生育稍示差異，即 35°C 之生育情形，L. 5, L. 7 號菌比 L. 6 號菌爲優，而 20°C 之生育，却反是 L. 6 號菌較爲良好等，似前者稍傾向高溫，而後者傾向低溫之趨勢，但均能生育於 35°C，比石澤氏之結果顯示略高，生育最適宜溫度，均爲 26～30°C 範圍，與前記結果尙稱符合。

2. 死滅溫度

實驗方法

酵母抽出液甘露醇培養液各 10 ml 分注於試管，殺菌後浸置於 45°, 50°, 55°, 60°C 電氣恒溫水槽內10分鐘（因試管厚薄不一，管內之培養液須 3～6 分鐘，始可達到所要溫度，故延長爲10分，以期均一），而接種同培養液之新鮮培養菌一鉑耳量，振盪混合務使菌種均勻分佈，繼續浸漬

各10, 30, 60 分後，取出該試管立即移至流水使其迅速冷却，然後移置於 25°C 定溫器培養 7～10 天，並觀察其生死情形，每處理以三試管爲一組，時間以每試管於接種時起算，並設不加溫試管爲對照。

實驗結果

表五　魯冰菌之死滅溫度

Table 5. Thermal death time of Rh. lupini

溫度 Temperature °C	45			50			55			60
時間分 Time min / 菌種 Strain	10	30	60	10	30	60	10	30	60	10
L. 5	+	+	+	+	+	+	±	−	−	−
L. 6	+	−	−	+	−	−	−	−	−	−
L. 7	+	+	+	+	+	−	±	−	−	−

＋：生育 Growth　　－：死滅 No growth

±：只一試管示生育 Only one tube showed growth in triplicate

一般言，根瘤菌之耐冷性强而耐熱性較弱，其死滅溫度以培養液組成，pH 值及菌之新舊等而有差異，Waksman 氏[7]認爲 60～62°C，Fred. Baldwin, McCoy 氏[21]謂，於 60°C 水中，2～3 分即爲死滅。Alicante 氏[22] 謂，50°C 爲死滅溫度，石澤氏[19] 對魯冰菌之死滅溫度試驗結果，50°C 10分者各菌種均能生育，30分者生死參差，但 55°C 10分者即殆死滅云。

本試驗結果如表五所示，L. 5 號菌之耐熱力似較强，即於 45°C, 50°C 者，10～60 分均能生育，55°C 10 分者三試管中只一管生存外，同 30～60 分及 60°C 10 分即行死滅。L. 7 號菌則於 55°C 10分一試管顯示生存外，50°C 60分及 55°C 30～60分，60°C 10分均示死滅。L. 6 號菌之耐熱性最差，45°C 及 50°C 10 分者，雖能生育，同 30分以上及 55°C 10 分均示死滅，此點與其於 35°C之生育顯示較差情形甚爲符合。

總之供試菌種之死滅溫度可認爲較低，顯示均不能生育於 60°C 10分，而殆均死滅於 55°C 10分。

(四)魯冰菌之抵抗力

氯化鈉濃度對菌生育之影響

實驗方法

調配未含氯化鈉成份之酵母抽出液甘露醇培養液，以濾紙過濾後加適量之再結晶氯化鈉，使其氯化鈉濃度自 0～3.0%，設11區分之培養液。並分注各 10 ml 於試管，各濃度以三試管爲一組，如常法殺菌後，接種新鮮培養菌一鉑耳量，於 28°C 培養 7 天後，以溷濁度觀察其生死及生育優劣情形。

實驗結果

表六　氯化鈉濃度對魯冰菌生育之影響

Table 6. Effect of NaCl concentration on the growth of Rh. lupini

濃度 Concentration % / 菌種 Strain	0	0.005	0.01	0.05	0.1	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
L. 5	╫	╫	╫	╫	╫	±	−	−	−	−	−

L. 6	⧻	⧻	⧻	⧺	+	−	−	−	−	−	−
L. 7	⧻	⧻	⧻	⧺	+	−	−	−	−	−	−

±：生育頗不良 Very poor growth　　+：生育不良 Scant growth
⧺：生育良好 Moderate growth　⧻：生育優良 Vigorous growth　−：無生育 No growth

Na 鹽對作物生育上，一般認爲非必須成份，而微量者雖可促進其生育，但過量者却有阻害作用[23]。Hilgard 氏[23]謂氯化鈉對作物之有害界限爲 0.2～0.5%。大杉氏[24]謂大巢菜 (Hairy vetch) 之生育界限爲 0.2%。根瘤菌對氯化鈉之抵抗力，據板野、杉浦兩氏[25]之研究，紫雲英及三葉草 (Hubam clover) 根瘤菌之耐鹽界限爲 3.5～4.0%，而 0.01～0.5%之生育比無添加區之生育爲優良云。今村氏[26]謂，大豆菌之耐鹽界限爲 2.0%，且鹽濃度 0～0.1%之生育爲最優。本試驗結果，L. 5 號菌之耐鹽界限 0.5%，而 0～0.05%爲生育優良範圍，顯示略高外，L. 6, L. 7 號菌則 0.1%爲界限，而 0～0.01%爲優良，尤其無添加區之生育均甚優良，顯示本根瘤菌之耐鹽力比前記紫雲英、大豆等根瘤菌爲弱。蓋本根瘤菌之寄主 (Host plant) 魯冰爲强耐酸性植物，因此，本菌之嫌鹽性，與寄主植物之植生相關上，可謂互相適應也。

(五)碳素源對菌之生育及醱酵

根瘤菌於各種碳素源之生育情形及對種種糖質之醱酵性，因菌之種類及菌株 (Strain) 之不同，而對碳素源之選擇性，及利用代謝機能等生理的性質有所差異。致使對各種碳素源之生育，及各糖質之分解及生酸等，顯示種種差異。諸多學者依該生理特性爲類別之依據，故斯項研究頗多[27,28,29,30]。玆爲究明本菌種對各種醣類之作用，及醱酵情形施行本試驗如次。

實驗方法

1. 基本培養液

在預備實驗中，以硝酸鉀甘露醇 (Nitrate Mannitol Solu.)[12] 加 Brom thymol blue 指示藥之合成培養液，培養結果，如 Baldwin, Fred 兩氏[27]所認，魯冰菌之生育頗緩慢且不良。故參照石澤氏[19]培養液並稍加改變後，使用爲基本培養液，其組成份如次：

K_2HPO_4	0.7 gm	$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	0.1 gm
KH_2PO_4	0.3 gm	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	痕跡量
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 gm	酵母抽出液 (Yeast ext.)	25 ml
NaCl	0.2 gm	蒸溜水 (water, dist.)	975 ml

2. 供試碳素源

五碳醣 (Pentose)……樹膠糖 (Arabinose)，木質糖 (Xylose)
六碳醣 (Hexoses)……葡萄糖 (Glucose)，分解乳糖 (Galactose)
甘露蜜糖 (Mannose)，果糖 (Fructose)
双醣類 (Disaccharides)……蔗糖 (Sucrose)*，乳糖 (Lactose)
麥芽糖 (Maltose)
三醣類 (Trisaccharides)……綿實糖 (Raffinose)
多醣類 (Polysaccharides)……糊精 (Dextrin)
多價醇類 (Polyhidric alcohols)，甘油 (Glycerol)，甘露醇(Mannitol)

* 臺糖製，市販白糖。

3. 實驗方法

調配基本培養液，以濾紙過濾後加適量碳素源，調製含各種醣類濃度 1 % (2 g/200 ml) 之培養液，分注各 10 ml 於試管，於常氣壓下 100°C 30分，施行間歇殺菌三天以期防止糖質分解，其 pH 值列於表七。各醣類以三試管爲一組，並設不加糖之基本培養液爲對照。接種酵母抽出液甘露醇培養液之新鮮培養菌一鉑耳量，於 25°C 培養，培養期間中觀察其生育情形，14天後比較培養液之溷濁度，並調查各菌種之生育優劣，並以玻璃電極測定培養後 pH 值之變化。

實驗結果

表七　各種碳素源對魯冰菌之生育及醱酵

Table 7. Growth and fermentation characters of Rh. lupini on various carbon sources

碳素源 Carbon source / pH 值 殺菌後 after sterilizn. / 菌種 Strain / 生育及 pH 值 Growth & Reaction		對照 Control	樹膠糖 Arabinose	木質糖 Xylose	葡萄糖 Glucose	分解乳糖 Galactose	甘露蜜糖 Mamnose	果糖 Fructose	蔗糖 Sucrose	乳糖 Lactose	麥芽糖 Maltose	綿實糖 Raffinose	糊精 Dextrin	甘油 Glycerol	甘露醇 Mamnitol
		7.11	6.86	6.80	7.00	7.01	7.00	6.65	7.02	7.00	6.95	7.06	7.00	7.08	7.05
L. 5	生育 Growth	++	+++	+	++++	++++	++++	+	++++	++	+++	++	+++	+++	++++
	pH	7.20	6.92	6.65	7.05	7.10	7.15	6.60	7.10	7.20	7.15	7.32	7.20	7.20	7.15
L. 6	生育 Growth	++	+++	+	++++	++++	++++	±	++++	++	+++	++	++	+++	++++
	pH	7.30	6.80	6.60	7.03	7.05	7.10	6.60	7.10	7.20	7.16	7.30	7.21	7.20	7.10
L. 7	生育 Growth	++	+++	+	++++	++++	++++	+	++++	+++	+++	++	+++	++++	++++
	pH	7.30	6.90	6.80	7.02	7.10	7.10	6.60	7.12	7.20	7.15	7.30	7.10	7.15	7.10

生育 Growth　± : 不顯明 Doubtful　+ : 不良 Scant　++ : 良好 Moderate　+++ : 優良 Vigorous　++++ : 頗優良 Very vigorous

據 Waksman 氏[7] 謂，根瘤菌之碳素源，以麥芽糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇爲最優良，而乳糖、甘油、糊精亦可利用。石澤氏[19] 謂，魯冰菌之碳素源之選擇性較大，概以六碳醣、五碳醣爲良好，多價醇類次之，双醣類者以麥芽糖爲良好外其他均不良，又謂，可從樹膠醣、木質糖生酸外，其他則不生酸。據 Eckhardt 氏等[29] 之研究結果，認爲魯冰菌之碳素源，以分解乳糖爲最優，而葡萄糖、果糖、麥芽糖、綿實糖亦顯示良好，樹膠糖、木質糖之生育概爲不良，以鼠李糖 (Rhamnose)、樹膠糖、木質糖三種顯示生酸外，其他醣類均不生酸而反使培養基反應鹼性化云。

本試驗結果如表七所示，L. 5 號菌則葡萄糖、分解乳糖、甘露蜜糖、蔗糖、甘露醇之生育爲最優良，樹膠糖、麥芽糖、糊精、甘油次之，乳糖、綿實糖尙屬中等，木質糖、果糖爲最差。L. 6 號菌之生育則果糖顯示頗爲不良，且糊精亦較差。L. 7 號菌者，甘油、乳糖兩種反顯示較優外，概與 L. 5 號菌有同樣傾向。

培養後培地反應之變化情形，三菌株俱於樹膠糖、木質糖、果糖以外之糖類，顯示顯明之鹼性反應。生酸而培養基酸性化者，則 L. 5, L. 6 號菌於木質糖示較顯明外，L. 7 號菌則無變化。又 L. 6 號菌於樹膠糖，顯示稍酸性化傾向外，L. 5, L. 7 號菌則反顯示微鹼性化傾向。果糖雖略示酸性化，但其生育情形，三菌株均顯示頗爲不良，且殺菌前與殺菌後之 pH 值變化爲最大等，似因該糖品質低劣或糖質之分解所致，但詳細情形認爲值得今後再檢討。

以培養後 pH 值之變化程度而言，綿實糖 (pH 7.06→7.30～7.32) 爲最大，葡萄糖 (pH 7.00→7.02～7.05) 爲最小，但可謂概爲甚微，此點據 Baldwin, Fred 兩氏[27] 謂，係因基本培養基酵母抽出液之緩衝容量較大所致云。

總之，本魯冰菌之碳素源概以葡萄糖、分解乳糖、甘露蜜糖、蔗糖及甘露醇爲最優良，乳糖、綿實糖亦可利用，木質糖爲最差，對各種糖之生酸性者，則木質糖顯示較顯明及樹膠糖略示生酸傾向外，其他糖類不能生酸，均顯示顯明之鹼性反應。

五、接 種 試 驗

試驗方法

選擇未栽植過魯冰之耕地，施行田間接種試驗如次，第一年於屈尺茶業指導所附近農家，及平鎮茶業試驗分所，第二年於關西鎮茶園，魚池茶業試驗分所及本所園藝系圃場施行。其田間設計，第一年小區面積 12×0.8 m，三重複，第二年小區面積 6×3 m，五重複等差異外，均採用隨機區組排列。處理分為接種區於無接種對照區。均無施肥，魯冰種子爲黃花種 (Lupinus luteus)，無消毒，種子量 3 gm/m。根瘤菌接種，係將種子浸漬於酵母抽出液甘露醇斜面培養之各該菌種懸濁液，半小時行之，對照區者以淸水代替。然後點播，蓋土並照當地慣行法栽培管理。播種日期概爲十月下旬，至翌年三月上旬收獲。並調查其株高，根瘤形成情形，鮮物總收量，及測定其水份，全氮含量。

試驗結果

兩年之田間接種試驗結果，除平鎮試驗地，因氣候影響，魯冰發芽受阻，生育中枯死等，成績缺正確而不列入外，其他四處之結果如表八。

表八　魯冰根瘤菌田間接種試驗之結果

Table 8. Sesults of field inoculation experiment of Rh. lupini

試驗地 Locality	屈尺 Chui-chih					關西 Kuan-hsi				
處理 Treatment \ 項目 Item	株高 (公分) Average height (cm)	鮮物收量 (公斤/公頃) Fresh yield (kg/ha)	水份 (百分比) Moist. (%)	全氮 (百分比) Total N. (%)	氮固定量 (公斤/公頃) N. Fixed (kg/ha)	株高 (公分) Average height (cm)	鮮物收量 (公斤/公頃) Fresh yield (kg/ha)	水份 (百分比) Moist. (%)	全氮 (百分比) Total N. (%)	氮固定量 (公斤/公頃) N. Fixed (kg/ha)
L. 5 號菌接種 Inoculated	73.1	24,827	86.6	0.330	81.9	35.1	2,211	84.2	0.334	7.4
L. 6 號菌接種 Inoculated	80.6	30,321	86.0	0.371	112.5	32.4	2,269	86.3	0.348	7.9
L. 7 號菌接種 Inoculated	72.8	26,581	86.3	0.358	95.2	32.2	2,152	86.0	0.359	7.7
對照 Control.	21.7	3,474	84.7	0.415	14.4	11.6	373	83.4	0.445	1.7

試驗地 Locality	魚池 Yu-chi					本所 Taipei				
處理 Treatment \ 項目 Item	株高 (公分) Average height (cm)	鮮物收量 (公斤/公頃) Fresh yield (kg/ha)	水份 (百分比) Moist. (%)	全氮 (百分比) Total N. (%)	氮固定量 (公斤/公頃) N. Fixed (kg/ha)	株高 (公分) Average height (cm)	鮮物收量 (公斤/公頃) Fresh yield (kg/ha)	水份 (百分比) Moist. (%)	全氮 (百分比) Total N. (%)	氮固定量 (公斤/公頃) N. Fixed (kg/ha)
L. 5 號菌接種 Inoculated	99.6	35,244	86.5	0.317	111.7	91.6	23,916	86.5	0.331	79.2
L. 6 號菌接種 Inoculated	99.0	37,710	87.1	0.331	124.8	100.0	27,469	86.1	0.352	96.7
L. 7 號菌接種 Inoculated	91.9	31,518	86.4	0.320	100.9	89.8	25,198	86.3	0.346	87.2
對照 Control	78.6	24,293	86.6	0.359	87.2	87.2	10,702	85.2	0.376	40.2

如表八所示，魯冰之株高，鮮物收量，因受氣候，土壤之性質及肥力等之影響，各地之成績雖

有差異，但接種區均比對照區爲優良。就中魚池之鮮物收量爲最佳且對照區亦然，關西則均顯示不良。玆檢討其原因，前者係屬於黃色灰化土，而土壤有機質含量較多，且農工誤施一次追肥（人糞尿），後者却係屬紅棕壤且頗缺乏有機質等，似因該園地之肥力頗瘦瘠所致。

以水份含量而言，最高者爲魚池 L. 6 號菌之 87.1%，而關西對照區之 83.4%爲最低，概在86%左右，各地區均示對照區之水份含量較低之趨勢。

全氮含量，則關西對照區之 0.445%爲最高，而魚池 L. 5 號菌之 0.317%爲最低，而概在0.33～0.36%範圍，又各地區均示對照區之含量較高之趨勢。

氮固定量計算結果，如表所示，接種區均示頗高，各地區均以 L. 6 號菌爲最高。

總之，接種區之魯冰生育及鮮物收量均甚優異，且於主根或支根部位，形成多數根瘤，但對照區則魯冰生育矮小，鮮物收量亦低，且幾無根瘤形成等，本菌種之有效性可謂極爲顯著，尤以 L. 6 號菌之效果最優良。

六、摘　　　要

臺灣之茶園，殆分佈於肥力較低之黃棕壤或紅棕壤地帶。近年來爲提高土壤有機質而增進生產力，以期茶量增產爲目的而栽植魯冰充作茶園綠肥，甚爲盛行。

本研究爲配合魯冰栽培時，行純粹培養菌接種之需要而舉行。玆就魯冰根瘤菌之分離、形態、培養及生理的性質，並田間接種試驗等，所得結果，摘要如下：

1. 魯冰菌之酵母抽出液甘露醇培養五天之菌體，概呈短桿狀乃至桿狀。格氏染色性爲陰性。鞭毛爲單極毛。

2. 殆不發育於 Gelatin 培養基，且無液化性。馬鈴薯斜面上之發育頗不良，石蕊乳精培養示無乳清層形成，且使其反應鹼性化。

3. Indol. 硫化氫均不產生，而生成氨氣並具硝酸鹽還元性。

4. 本根瘤菌生育之最適宜 pH 値爲 pH 5.5～6.9，而概以 pH 4.91 爲生育之酸性界限。

5. 本菌生育之最適宜溫度爲 26～30°C，於 40°C 則均不能生育。於 50°C10分猶能不死，但 55°C 10分者概即死滅。

6. 本菌對氯化鈉之抵抗力頗低，氯化鈉濃度達 0.05%以上者則受其阻害。

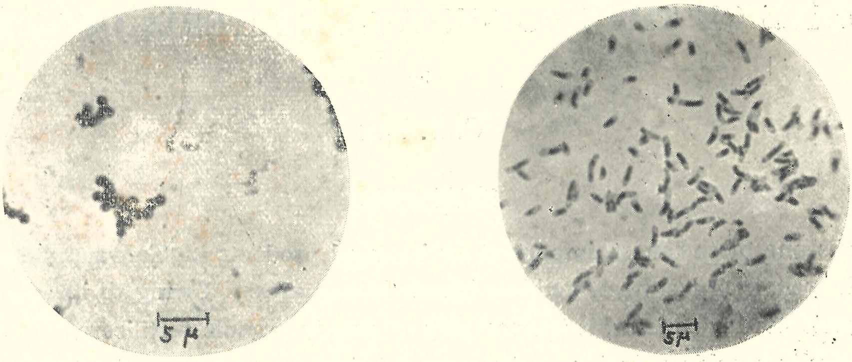
7. 本菌生育上適宜之碳素源，以葡萄糖、分解乳糖、甘露蜜糖、蔗糖、甘露醇爲最優良。木質糖之生育最差。對於木質糖生酸較顯明，樹膠糖有生酸傾向外，其他之糖類則不生酸，反使其反應鹼性化。

8. 本菌種之田間接種效果，均甚顯著，就中 L. 6 號菌之效果爲最高。

參　考　文　獻

(1) K. W. Leung, T. T. Chen: Soils of Taiwan. J. Agr. Assoc. of China New. Seri 20 (1957).
(2) 農林廳農復會合編：茶園增產淺說
(3) 小西龜太郎：綠肥と根瘤菌の研究(昭24)
(4) Waksman, S. A.: Soil Microbiology, 208-228 (1952).
(5) Breed, R. S., Murray, E. G. D., Hitchens, A. P.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th. Ed. (1957).
(6) Erdman, L. W.: Legume Inoculation, What it is?. What it does?, U. S. Dep. of Agr. Farmer's Bull, No 2003 (1948).
(7) Waksman, S. A.: Principles of Soil Microbiology; 122-138 (1927).
(8) 足立仁、平林成志：臺灣土壤の微生物學的研究，第6報，看天田土壤の微生物學的性質に就いて，熱帶農學會誌，5, 2, 107 (1933)
(9) 小野勇五郎：綠肥根瘤菌の接種に就いて，臺灣農會

(10) 吳 敏 慧：羽扇豆根瘤菌之分離與試驗，農林學報 4 (1955)
(11) ______：臺灣根瘤菌人工接種之研究，土壤肥料通訊第111期(1960)
(12) Fred, E. B., Waksman, S. A.: Laboratory Manual of General Microbiology (1928).
(13) Allen, O. N.: Experiments in Soil Bacteriology, 115 (1951).
(14) 東京大學農學部：實驗農藝化學上卷(昭27)
(15) Salle. A. J.: Laboratory Manual on Fundamental Principles of Bacteriology. (1948)
(16) Löhnis, F., Hansen, R.: Nodule bacteria of leguminus plants. J. Agr. Res. 20 (1921).
(17) 宮路憲二：應用菌學下卷 32(1958)
(18) 瀧元清透：微生物學及植物病理學實驗法 (昭17)
(19) 石澤修一：荳科植物の根瘤菌に關する研究，日本土肥誌，24, 163, 169, 227 (1953)
(20) Allison, F. E., Minor, F. W.: The effect of temperature on the growth rate of Rhizobia, Jour of Bact. 39, 365 (1940).
(21) Fred, E. B., Baldwin I. L., McCoy, M.: Root nodule bacteria and leguminous plauts, Univ, of Wisconsin Press, Madi, Wis. (1932).
(22) Alicante, M. M.: The viabillity of the nodule bacteria of legumes outside of the plant, Soil Sci, 21, 27 (1926).
(23) 青木茂一：土壤と植生，訂四版 296~397 (昭33)
(24) 大杉 繁：土壤化學第三編 60 (1947)
(25) 板野新夫：土壤微生物學六版 257 (昭15)
(26) 今村利雄：青皮豆根瘤菌に就いて，臺北農林學會報 1~3 258 (1936)
(27) Baldwin, I. L., Fred, E. B.: The fermentation characters of the root nodule bacteria of leguminosae, Soil Sci, 24, 217 (1927).
(28) Foote, M., Peterson, W. H., Fred, E. B.: The fermentation of glucose and xylose by the nodule bacteria from alfalfa, clover, pea and soyboon, Soil, Sci 28 (1929).
(29) Eckhardt, M. M., Baldwin, I. L., Fred. E. B.: Studies of the root nodule organism of lupinus, Jour. of Bact. 21, 273 (1931).
(30) Walker, R. H., Brown, P.. E.: Some fermentation characteristics of various strains of Rh. melilot. and Rh. japonicum, Soil Sci. 30, 219 (1930).



圖一　魯冰根瘤菌及其鞭毛

Fig 1. Rhizobium lupini (Strain L6.) and its flagella stain

圖二　魯冰根瘤菌田間接種試驗之魯冰生育

Fig 2. Showing the growth of L. luteus in field inoculation experiment.

圖三　各處理之根瘤形成狀況

Fig 3. The Differences in nodulation by inoculated with three strains of Rhizobia and uninoculated.

STUDIES ON THE ROOT-NODULE BACTERIA OF LUPINE

by

C. T. LIN

SUMMARY

Tea is one of the most important agricultural products in Taiwan, and is mostly grown in yellowish brown or reddish brown latosol areas. Owing to its low fertility and organic matter content, it is necessary to supply organic fertilizers.

Generally speaking, lupine is the most suitable green manure for tea garden. In order to obtain the beneficial nodule bacteria for inoculation use, several strains were isolated from nodule of lupine, and concerning their morphology, cultural and physiological characters, as well as field inoculation experiments were studied.

The results obtained are summarized as follows:

1. The cells of Rhizobium lupini taken from five days culture in yeast extract mannitol agar were short rods or rods, Gram-negative, and the flagella were monotrichous.

2. On gelatin medium they showed very scant growth, and no liquefaction was observed. On potato slopes, they showed thin, meagre, transparent growth, and potatoes were not changed in colour. On litmus milk they showed slightly alkaline reaction, and no serum zone was formed.

3. All strains showed no formation of indol and hydrogen sulfide, but ammonia was formed, and nitrite was produced from nitrate.

4. The optimum pH value for the growth was pH 5.5–6.9, and it seems that pH 4.91 was the limit of the acid side.

5. The optimum temperature for the growth was 26–30°C, and all strains were unable to grow at 40°C. They could grow for ten min. at 50°C, but could not grow for ten min. above 55°C.

6. All strains showed very low resistance to sodium chloride, the growth of Rhizobia was obstructed on the concentration above 0.05 percent.

7. Glucose, galactose, mannose, sucrose and mannitol were the best carbon sources for the growth of Rh. lupini. The reaction of most carbon compounds became alkaline reaction, except that, the xylose and arabinose were acid reaction, but the former was rather remarkable than the latter.

8. The results of field inoculation experiment showed that all strains were very effective, particularly the strain L. 6 which produced the highest yield in all localities.